第 41 卷 第 3 期　　昆虫学报　　Vol. 41, No. 3
1998 年 8 月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　Aug., 1998

家蚕染色体复制区带的初步显示

王亚军　王喜忠　李　娟　王子淑
（四川联合大学生物学系，成都　610064）
杨　彪
（四川蚕业制种公司，成都　610041）

摘要　该文采用家蚕 *Bombyx mori* 活体注射 BrdU 结合 FPG（fluorochrome photolysis Giemsa）显带方法，以生殖腺为材料，成功显示出家蚕有丝分裂中期染色体复制带。由于处于 S 期的细胞有早有晚，且同一细胞 DNA 各片段的复制亦有先后，因此 BrdU 掺入 DNA 合成的时间也有所不同，从而可产生出早、中、晚复制带型。BrdU 掺入时间早，则会在家蚕部分染色体上出现大面积浅染带纹的早复制带。每一染色体皆有其独特的带纹特征，据此可初步将它与其它染色体相互区分；随着 BrdU 掺入时间的推后，染色体上会出现深浅交替、丰富的带纹，即中复制带型；至 S 期 DNA 合成晚期掺入 BrdU，最终染色体出现以深染带纹为主，浅染带纹仅出现于少数染色体的中部、近中部或端部的晚复制带。

关键词　家蚕，染色体，复制带

家蚕 *Bombyx mori* 染色体的研究始于外山（1894），后经数人研究证实，无论雌雄个体，染色体数目均为 $2N=56$。随着制片技术的改进，能获得分散良好的中期染色体，并可准确计数。然而，迄今为止，所有对家蚕有丝分裂中期染色体的研究结果均发现：家蚕中期染色体形态小，数目多；染色体上无初级缢痕，具弥散性着丝粒，染色体呈均一的短棒状或颗粒状；各号染色体在相对长度上呈连续性变化[1~3]。家蚕有丝分裂染色体的特殊性，使得同源染色体配对以及各号染色体间的准确区分格外困难。

尽管各种显带技术，如 G-带、Q-带、C-带、R-带、Ag-NORs 等在 70 年代中已在绝大多数哺乳动物中得到广泛而深入的应用，然而国内、外对家蚕染色体的显带研究几属空白[4]，这无疑阻碍了家蚕细胞遗传学的深入开展。

采用 BrdU 活体注射法，结合 FPG（fluorochrome photolysis Giemsa）显带技术，首次成功地获得了分化良好的家蚕有丝分裂中期染色体复制带，并依据带纹特征进行同源染色体配对。通过对早、中、晚复制带型的观察，初步描述了家蚕染色体的复制特征。家蚕染色体复制带的研究不仅为家蚕同源染色体配对及各号染色体的区分提供了依据，而且对家蚕基因定位、育种及家蚕细胞遗传学的深入开展具有重要的理论和实践意义。同时活体注射 BrdU 的方法与复制带显示技术也可成为其它昆虫染色体显带研究的借鉴。

1996-08-03 收稿，1997-04-07 收修改稿

1 材料与方法

1.1 实验材料

家蚕4龄或5龄幼虫，品种为782·734，由四川省三台县蚕种场提供。

1.2 实验方法

1.2.1 5-溴-2′-脱氧尿嘧啶（BrdU，Sigma公司提供）活体注射以及秋水仙素处理：取家蚕4龄幼虫、5龄六日或七日幼虫（♀、♂各50只），自家蚕腹足处注BrdU入血液中（BrdU剂量为0.5 mg/g蚕体重），处理2 h后，再自腹足处注入秋水仙素0.1 mL（0.1 mg/mL）处理12 h。

1.2.2 有丝分裂中期染色体的制备：自家蚕腹部剖开，取出雌、雄生殖腺，置于0.65%生理盐水中，摘除生殖腺周围附着的脂肪组织。然后将生殖腺置于洁净的匀浆器中，加入5 mL 0.4%KCl，迅速轻微挤压至细胞分散。低渗10～15 min后，加入新配制的固定液（甲醇：冰醋酸=1：1（v：v））1 mL，预固定5 min后，转入离心管中，1 500 r/min离心10 min，去上清，向细胞沉淀中加入新配制的固定液5 mL，固定20 min。1 000 r/min离心10 min，去上清，保留细胞沉淀。如此将细胞反复固定、离心3次。最后向细胞沉淀中加入少许固定液，混匀，制成细胞悬液，滴于湿冷玻片上。空气干燥。

1.2.3 复制带的显示：将制备好的染色体标本，浸入0.1%的吖啶橙中（用0.067 mol/L，pH 6.8的磷酸盐缓冲液配制），处理10～15 min。取出标本，用0.067 mol/L（pH 6.8）的磷酸盐缓冲液洗涤3次，晾干后，再将玻片置于45℃～50℃水浴锅中的铝饭盒内，细胞面朝上，加入2×SSC（含0.3 mol/L NaCl，0.03 mol/L柠檬酸钠），使2×SSC淹没玻片。立即用30W紫外灯照射。照射距离为5～10 cm，照射时间为30～40 min。照射完毕后，取出玻片，用双蒸水洗涤玻片，晾干。用20%Giemsa染色15～20 min，流水冲洗，晾干，镜检，拍照。

1.2.4 普通染色：用20% Giemsa染色15～20 min，流水冲洗，晾干，镜检。

2 结果与分析

2.1 家蚕染色体复制阶段的划分

BrdU复制带是建立在胸腺嘧啶核苷类似物BrdU在DNA复制过程中的掺入和BrdU掺入后的DNA片段同无BrdU掺入的DNA片段对显色剂处理具不同的显色效应的基础上的。本次实验所采用的FPG显带技术处理染色体后，BrdU替代的染色体片段被染成淡兰色，而未被BrdU替代的染色体片段则染成深红色。在家蚕染色体上得到的这种深浅交替带纹即为复制带。

S期DNA的复制是一个较长动态的过程，且DNA上各片段的复制亦有先后之分。BrdU在S期掺入时间的早晚，将决定BrdU所替代的片段以及所替代的片段大小。掺入BrdU的染色体经FPG显带技术处理后，可产生出与BrdU掺入时间相应的复制带型，真实反映出家蚕染色体上各片段复制先后顺序。

虽然本次实验是在同一时间向蚕体内注入高浓度的BrdU，但由于蚕体中具有丝分

裂能力的细胞并非同步化细胞，因而 BrdU 掺入 S 期细胞 DNA 复制过程的时间亦不尽相同。根据 BrdU 掺入 S 期 DNA 合成过程的时间，可将其大致分为复制早期、复制中期和复制晚期三个阶段。因而最终在家蚕染色体上显现出的带纹也可分相应划分为早、中、晚三种复制带带型。

2.1.1 早复制带：是指细胞在有 BrdU 掺入前已完成部分 DNA 复制，其余尚未复制的大部分 DNA 则是在 BrdU 掺入细胞后继续完成复制的。该时期因有 BrdU 大量掺入 DNA 双链，因而经显带技术处理后，最终在部分染色体上表现出大面积浅染，未掺入 BrdU 的染色体片段已较早完成 DNA 复制，表现为深染带纹。这种带型即为早复制带。

2.1.2 中复制带：是指 S 期 DNA 复制过半时，BrdU 才取代胸腺嘧啶（dT），掺入 DNA 合成过程。最终在染色体上出现深浅带纹交替分布、各占一半的复制带带型。

2.1.3 晚复制带：细胞已完成大部分 DNA 复制，仅余少部分 DNA 仍未复制。此刻 BrdU 的掺入，将最终在染色体上出现少数狭窄浅染区。未掺入 BrdU 的染色体片段表现为深染区，该种带型即为晚复制带。

当然，将 BrdU 掺入 S 期时间人为划分为早、中、晚三个阶段，以及染色体带型划分为早、中、晚三种类型，仅说明中期染色体有 BrdU 掺入的部分（浅染区）是 S 期尚未复制的 DNA 部分，未被 BrdU 掺入的染色体部分（深染区）恰是 S 期已完成 DNA 复制的部分，具相对动态含义。

2.2 家蚕染色体早、中、晚复制带的主要带纹特征

2.2.1 从图中可以看出，虽然在复制早期阶段 BrdU 掺入染色体 DNA 中，最后染色体上出现的总体特征是多数染色体上出现了大面积的浅染区域，但就每一号染色体而言，都有其独特的带纹特征。且每一染色体的复制不完全同步，复制程度也出现明显差异。如 No. 3、No. 4、No. 7、No. 12、No. 14、No. 15、No. 26 染色体在此阶段表现为大面积浅染，而仅在染色体的一端、两端、中部或近中部出现狭窄深染带纹（即最早复制的 DNA 片段）。这表明这些染色体大部分 DNA 的复制较晚进行。而在另外一些染色体，如 No. 5、No. 18、No. 21 染色体在此阶段则表现为近乎完全深染，仅有极少部分区域表现为浅染。这可能意味着该染色体已较其它染色体早完成了 DNA 大部分的复制，而仅有该染色体少部分 DNA 片段是在 BrdU 掺入细胞后才完成整个染色体 DNA 的复制。其余染色体则多表现为深浅交替的不同的带纹特征。根据家蚕各号染色体在早复制阶段复制不同步所表现出的不同带纹特征，可以将各号染色体初步区分（图版 I）。

2.2.2 复制中期阶段掺入 BrdU，多数染色体表现为深浅交替、深浅带纹面积各占一半的丰富带纹（原有大面积浅染带纹由于 BrdU 在复制中期时掺入而被进一步细分为深浅分布的带纹）。但随着复制的进行，BrdU 掺入时间的推后，染色体上的带纹逐渐减少，深染区域进一步扩大，而浅染区域则进一步缩小（图版 Ⅱ：a、b）。

2.2.3 晚复制带的特征：由于 BrdU 掺入 S 期时间很晚，所以染色体上显出的带纹逐渐减少，浅染带纹更加狭窄。且晚复制区域（即浅染带纹）一部分集中于一些染色体的一端或两端，也有部分集中于一些染色体的中部或近中部。至 S 期最晚时期掺入 BrdU，则大部分染色体均已完成复制，仅在极个别染色体上出现狭窄浅染区域，为家蚕染色体上最晚复制的部分（图版 Ⅱ：c、d）。

目前，令人遗憾的是，尚不能确认性染色体。

2.3 BrdU 对染色体的影响

BrdU 掺入中期染色体后，未经显带技术处理，经 Giemsa 染色后，也能在一些染色体上出现微弱带纹分化，尤其在早中期染色体上表现较为明显。但这种带纹分化程度低，规律性不强，利用它进行染色体配对有极大困难。

3 讨论

3.1 家蚕染色体多重显带的困难

家蚕染色体较大多哺乳动物染色体小得多，获得的晚前期或早中期染色体过于纤细，因而经胰酶处理后，显出带纹细弱，不易获得可供带型分析的照片。随着染色体浓缩程度的增加，染色体亦愈来愈短，带间距愈来愈小，进而消失，显不出任何带纹。除上述原因外，家蚕染色体碱基组成及其分布也可能是多重显带不易显示的因素之一。我们曾采用 Q-显带，CMA_3/DA/DAPI 三重荧光染色，T-显带等多种显带技术处理家蚕染色体[4]，但很难在其上显现带纹或明暗反差低，或仅在染色体的端部或中部出现一些分化。而这些显带技术很明显与染色体上 AT 或 GC 碱基的性质和分布有关。这可能表明家蚕染色体上碱基分布的区域性差异不及多数哺乳类显著。

另外，家蚕染色体为弥散性着丝粒染色体（holocentric chromosome），不像单一着丝粒（monocentromere）染色体那样，有明显的初级缢痕，因而家蚕染色体在分裂中期形态多表现为短棒状或颗粒状。这对家蚕染色体配对及区分造成很大盲目性，也给显带后染色体的特征分析带来极大困难。

针对上述原因，建立适合于家蚕染色体多重显带的技术关键是：既要采取措施抑制染色体的过度浓缩，控制染色体具适当的长度。同时还必须设法扩大染色体的纵向分化，找出适当的显带方法，增加带纹间的明暗差异。

3.2 复制带显示方法是家蚕染色体显带研究的有效手段

抑制染色体过度浓缩，除降低秋水仙素的剂量等常规方法外，有多种 DNA 特异性结合物用来处理活细胞，是获得较长染色体的有效方法。这类物质有 BrdU[5]，AMD[6]，远霉素 A（distamycin，DA）[7]，吖啶橙（acridine orange，AO）等。

本次实验所采用的 BrdU 一方面作为胸苷类似物掺入 DNA 链，可视为研究 DNA 复制动态的标记物，另一方面，它自身也可阻遏染色体某些区域聚缩，掺入 BrdU 的区域较未掺入 BrdU 的区域伸展得多[8]。

有 BrdU 掺入的染色体，经 AO 染色，紫外光照射处理后，可增强深染带（dT 结合区）与浅染带纹（BrdU 结合区）之间的差异对比度，显示极为清晰的分带效果。看来采用 BrdU 活体注射结合 FPG 显带技术显示复制带不失为研究家蚕细胞遗传学的有效手段。

致谢　实验中得到本系魏海燕同志以及三台县蚕种场李茂森、祝启强同志的大力支持，特此致谢。

参　考　文　献

1 Murakami A, Imai H T. Cytological evidence for holocentric chromosomes of the silkworms *Bombyx mori* and *B. mandarina* (Bombycidae Lepidoptera). Chromosoma (Berl.), 1974, 47: 167～178

2 陈元霖，李晓彤，曾　寰等. 家蚕、蓖麻蚕、柞蚕、樟蚕核型研究. 厦门大学学报（自然科学版），1994，33(1)：89～95

3 王亚军，王子淑，王喜忠等. 家蚕胚胎细胞染色体研究. 四川大学学报（自然科学版），生物学专集，1996a，33：72～79

4 王亚军，王喜忠，王子淑等. 家蚕染色体显带研究. 四川大学学报（自然科学版），生物学专集，1996b，33：80～84

5 Cawood A H. Chromosome replication in fibroblasts of syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). Chromosoma (Berl.), 1981, 83: 711～720

6 Yu R L, Aronson M M, Nichols W W. High resolution bands in human fibroblast chromosomes induced by actinomycin D. Cytogenetic and Cell Genetics, 1981, 31: 111～114

7 Thust R, RXnne M. Structural modifications induced in Chinese hamster V79-E chromosomes by prefixation treatment in vitro with AT-specific agents netripsin, distamycin A, and Hoechst 33258. Hereditas, 1981, 94: 209～213

8 Zakharov A F, Egolina N A. Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. I. BrdU-Revealed differentiation in Chinese hamster chromosomes. Chromosoma (Berl.), 1972, 38: 341～365

PRIMARY STUDIES ON REPLICATION BANDING PATTERNS OF SILKWORM (*BOMBYX MORI*) CHROMOSOMES

Wang Yajun　　Wang Xizhong　　Li Juan　　Wang Zishu

(Department of Biology, Sichuan University, Chengdu　610064)

Yang Biao

(Silkworm Egg-breeding Company of Sichuan Province, Chengdu　610041)

Abstract　The mitotic chromosomes of silkworm *Bombyx mori* are prepared from gonads of fourth or fifth instar larvae 14 h after BrdU (5-bromo-2′-deoxyuridine) solution has been injected into the silkworm hemolymph. With the fluorochrome (FPG) banding technique, the replication banding patterns of silkworm mitotic chromosomes during the early, mid and late replications are successfully demonstrated. When BrdU incorporates into DNA synthesis early, the early replication banding pattern, showing large light-stained area on most chromosomes, can be observed. According to the characteristics of replication bands in each chromosome, homologous chromosomes can be identified; When BrdU incorporates into DNA synthesis at mid-way, the mid replication banding pattern, which displays more bands, can be observed; When BrdU incorporates into

DNA replication very late, only a few light-stained bands can be found near the terminal or middle area of some chromosomes. This kind of pattern is classified as late replication bading pattern.

Key words silkworm, chromosome, replication banding pattern

图 版 说 明

图 版 I

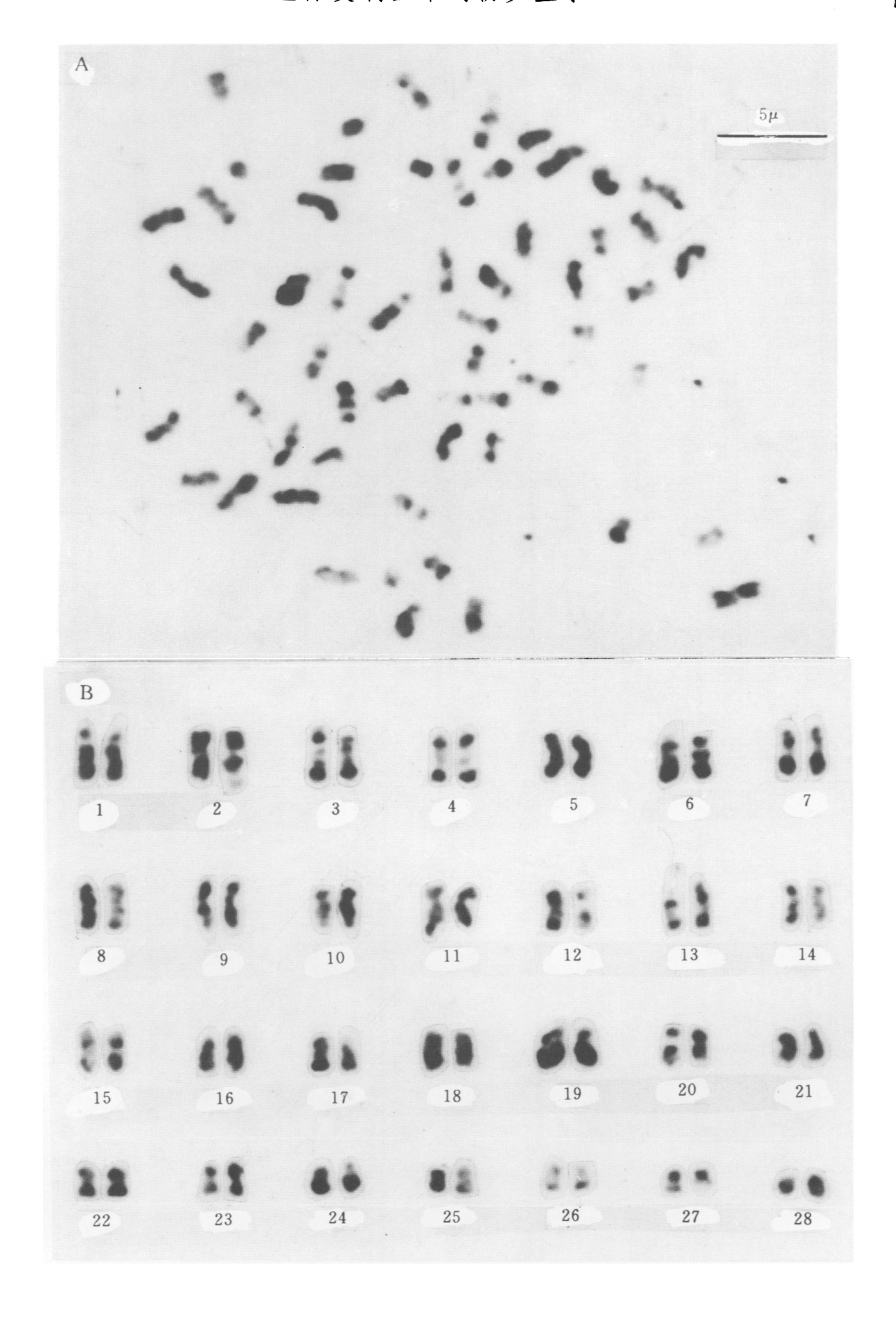
家蚕染色体早复制带

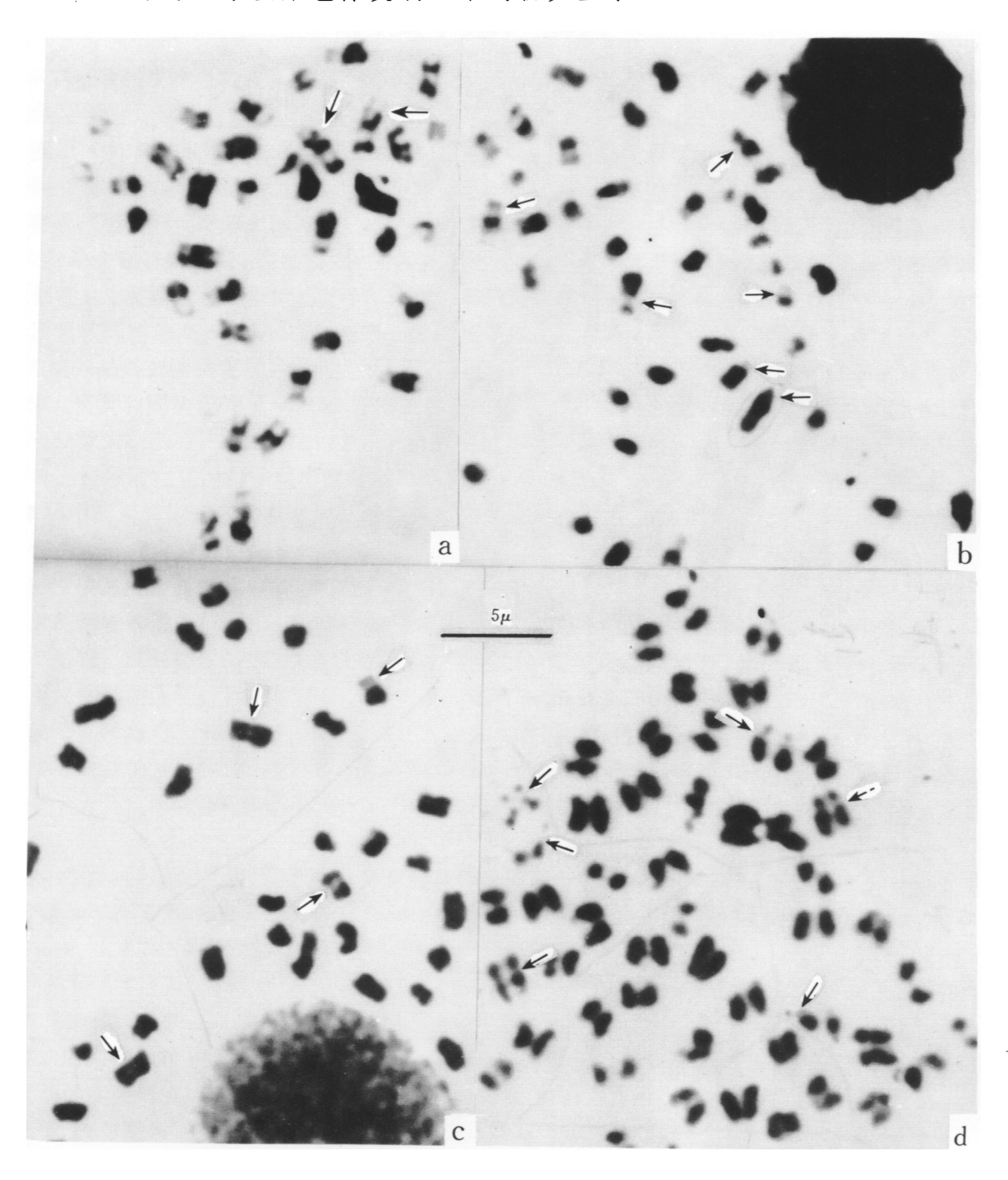
A. 家蚕染色体早复制带；
B. 家蚕染色体早复制带核型（由 A 剪贴而成）

图 版 II

家蚕染色体中、晚复制带

a. 丰富、清晰的中复制带纹（箭头示 No. 1 号染色体）；
b. BrdU 掺入稍晚的中复制带纹.（箭头示浅染带纹）；
c. 晚复制带纹.（箭头示晚复制的浅染区）；
d. 分裂后期中出现的部分浅染带（箭头示浅染带）


A
5μ
B
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28


5μ
a
b
c
d